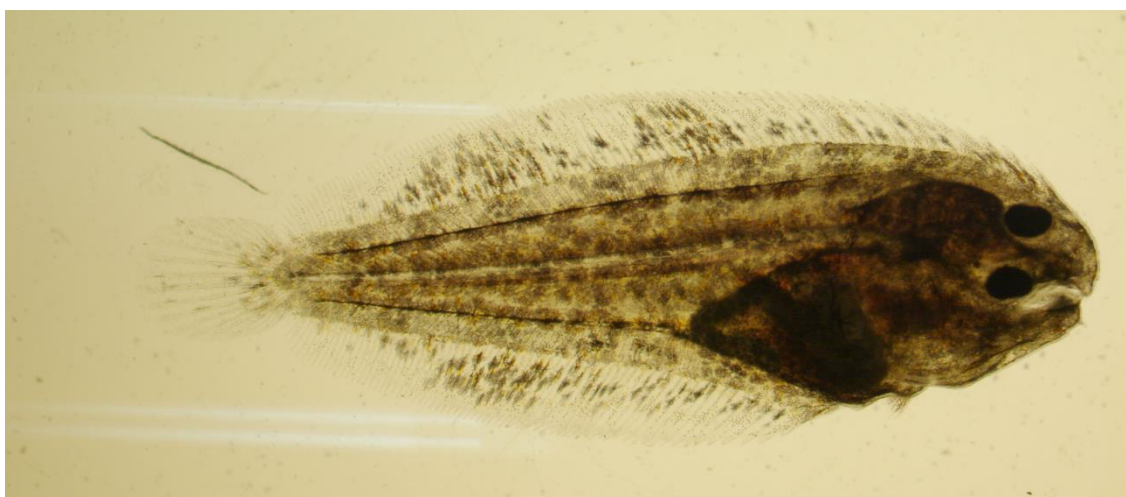


FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR Y AMBIENTALES
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA



Efecto de la incorporación de selenio a través de la dieta (rotíferos, *Brachiounus plicatilis*) en el desarrollo larvario de lenguado (*Solea senegalensis*, Kaup 1858)

TRABAJO DE FIN
GRADO EN CIENCIAS DEL MAR

(Septiembre 2017)

Fátima M^a Navas Porras

Dr. Juan Miguel Mancera Romero, Catedrático de Zoología de la Facultad de Ciencias del Mar y Ambientales de la Universidad de Cádiz y Dra. Marian Ponce García, investigadora postdoctoral contratada del Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera (IFAPA) Centro El Toruño, como Directores del Trabajo Fin de Grado titulado “Efecto de la incorporación de selenio a través de la dieta (rotíferos, *Brachiounus plicatilis*) en el desarrollo larvario de lenguado (*Solea senegalensis*, Kaup 1858)” realizado por Fátima Navas Porras.

INFORMAN:

Que el trabajo realizado en la presente Memoria se ha llevado a cabo bajo nuestra dirección en las dependencias del Laboratorio de Nutrición del Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera (IFAPA) Centro El Toruño

Y para que así conste firmamos el presente Trabajo Fin de Grado en Puerto Real (Cádiz) a 14 de septiembre de 2017.

Fdo.: Dr. Juan Miguel Mancera Romero

Fdo.: Dra. Marian Ponce García

Catedrático de Zoología de la UCA

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mi tutora Marian Ponce García por haber hecho posible esta memoria, por ayudarme y formarme en este tiempo, además de su paciencia conmigo. También quiero agradecer a mi co-tutor de la UCA, Juan Miguel Mancera Romero, por haberme dado esta oportunidad y animarme a llevarla a cabo.

También quiero mencionar a Inmaculada Giráldez, por los análisis de la determinación de Se total llevados a cabo en la Universidad de Huelva y haber estado disponibles para este trabajo. A mis compañeras de Laboratorio del centro IFAPA *El Toruño* por haberme ayudado en los momentos de mayor presión y quienes han formado parte de esta experiencia, como son Eugenia, M^a del Mar y Javier.

A mi familia le quiero agradecer su apoyo en los momentos de debilidad. Mis padres y mis abuelos que lo han dado todo por estar donde estoy hoy; y a mi hermano, porque siempre ha confiado en mí. En último lugar, agradecer a Andrés, por aguantar mis momentos de estrés y mis momentos pesimistas.

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Lenguado senegalés.....	2
1.2 Avances del cultivo del lenguado y su importancia en acuicultura.....	3
1.3 Desarrollo larvario de lenguado en acuicultura.....	4
1.4 El selenio como nutriente esencial en peces marinos.....	6
1.5 Objetivos.....	6
2. MATERIAL Y MÉTODOS.....	7
2.1 Protocolo de enriquecimiento de rotíferos	8
2.2 Cría larvaria y protocolo de alimentación.....	12
2.3 Determinación de selenio total y especiación.....	13
2.4 Crecimiento larvario y progreso de la metamorfosis.....	13
2.4.1 Peso seco.....	13
2.4.2 Tasa de crecimiento específica (SGR).....	14
2.4.3 Índice metamórfico.....	14
2.5 Extracción de ARN y análisis de la expresión génica.....	15
2.6 Análisis estadístico.....	15
3. RESULTADOS.....	16
3.1 Se total en rotíferos.....	16
3.2 Se total en larvas.....	17
3.3 Rendimiento larvario.....	19
3.4 Expresión génica.....	20
4. DISCUSIÓN.....	23
5. CONCLUSIÓN.....	24
6. BIBLIOGRAFÍA.....	28

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución geográfica de <i>Solea senegalensis</i>	1
Figura 2. Evolución de la producción acuícola de lenguado senegalés.....	3
Figura 3. Tubos de 15L utilizados para el enriquecimiento de rotíferos con Se(IV) y ORI-GREEN.....	8
Figura 4. Esquema simplificado de las distintas condiciones para realizar el experimento.....	9
Figura 5. Microsala donde se llevó a cabo el experimento.....	10
Figura 6. Esquema del régimen de alimentación de la larva <i>S. senegalensis</i>	10
Figura 7. Microalgas.....	11
Figura 8. Posición del ojo en los distintos estadios de la metamorfosis de la larva <i>S. senegalensis</i>	14
Figura 9. Contenido de Se total en los rotíferos usados para alimentar a las larvas	16
Figura 10. Contenido de Se total (mg Se Kg-1 PS) en larvas de lenguado alimentadas con rotíferos enriquecidos con Se(IV).....	17
Figura 11. Crecimiento (PS) de las larvas de lenguado alimentadas con rotíferos enriquecidos con Se(IV).....	18
Figura 12. Índice metamórfico de las larvas de lenguado alimentadas con rotíferos enriquecidos con Se(IV).....	19
Figura 13. Expresión génica relativa de tg durante el desarrollo de las larvas de <i>S. senegalensis</i> alimentadas con rotíferos enriquecidos con diferentes niveles de Se (Control, Se(IV) 3 y Se(IV) 4).....	20

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Enriquecimiento de rotíferos con Se(IV) y ORI-GREEN.....	7
Tabla 2. Protocolo de alimentación.....	12
Tabla 3. Tasa específica de crecimiento (SGR).....	18

Abstract

In the present study, we evaluate the effects of selenium (Se) on larval development of Senegalese sole (*Solea senegalensis*), a commercially important flatfish cultured in Southern Europe. Se is an essential trace element for living organisms and plays important roles in antioxidant defense systems, regulation of thyroid hormone as well as metabolism and cell growth. For this purpose, rotifers were enriched with selenite (Se(IV)) for 3 and 24 h (referred as Se(IV) 3 and Se(IV) 24). The total Se content of rotifers Se(IV) 3 and Se(IV) 24 was significantly higher than in the control group. However, selenomethionine (SeMet) and Se-methylselenocysteine (SeMetSeCys) were only detected in rotifers Se(IV) 24. Sole larvae were fed with enriched rotifers from 3 to 9 days post hatching (dph), and from 7 dph until the end of metamorphosis with *Artemia*. Total Se content in larvae decreased at 9 dph in all experimental groups. This reduction coincided with the beginning of the metamorphosis process. Moreover, larvae fed rotifers Se(IV) 3 and Se(IV) 24 did metamorphosis in a faster way. Genetic expression data revealed that larvae fed rotifers Se(IV) 24 modulates the transcript levels of thyroglobulin (*tg*). These results provide new clues on role of Se and its species in growth and metamorphosis progress of sole larvae.

Keywords: *Solea senegalensis*, rotifers, selenium, larval performance, thyroglobulin

Resumen

En el presente estudio, se han evaluado los efectos del selenio en el desarrollo larvario de lenguado (*Solea senegalensis*), un pez plano de gran importancia en acuicultura en el sureste de Europa. El Se es un elemento traza esencial para los organismos y tiene un papel importante en los sistemas de defensa antioxidante, la regulación de las hormonas tiroideas, metabolismo y crecimiento celular. Para ello, los rotíferos se enriquecieron con selenita durante 3 y 24h (nombrados como Se(IV) 3 y Se(IV) 24). El contenido de selenio total en los rotíferos Se(IV) 3 y Se(IV) 24 fue significativamente mayor que en los rotíferos del grupo control. Sin embargo, la selenometionina (SeMet) y la Se-metil selenocisteína (SeMetSeCys) solo se detectaron en los rotíferos Se(IV) 24. Las larvas de lenguado se alimentaron con los tres grupos de rotíferos desde 3 a 9 días después de la eclosión (dde), y desde 7 dde hasta el final de la metamorfosis con *Artemia*. El contenido de Se total en las larvas disminuyó a los 9 dde en todos los grupos experimentales, coincidiendo con el inicio de la metamorfosis. Además, las larvas alimentadas con rotíferos Se(IV) 3 y Se(IV) 24 realizaron la metamorfosis de manera más rápida. Los datos de expresión génica revelaron que las larvas alimentadas con rotíferos Se(IV) 24 modifican significativamente la expresión de la tiroglobulina (*tg*). Estos resultados aportan nuevas pistas sobre el papel del Se y sus especies en el crecimiento y progreso metamórfico de las larvas de lenguado.

Palabras clave: *Solea senegalensis*, rotíferos, selenio, rendimiento larvario, tiroglobulina

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Lenguado senegalés

El lenguado senegalés (*Solea senegalensis*, Kaup 1858) es un pez plano que pertenece a la familia Soleidae. Presenta ojos pequeños en el lado derecho, su cuerpo está ovalado y fuertemente comprimido. Se caracterizan por su hocico redondeado, carnoso y su boca pequeña más o menos arqueada. El preopérculo está cubierto por piel y escamas y no presentan espinas en las aletas; su aleta caudal es distinta, se encuentra uniformemente coloreada. La línea lateral forma una curva suavemente redondeada en la zona de los ojos y continúa recta en la mitad del cuerpo (Ben-Tuvia, 1999).

S. senegalensis es una especie bentónica que vive en fondos arenosos o fangosos y se distribuye desde el Golfo de Vizcaya hasta las costas de Senegal, en el Atlántico (Fig. 1). Se alimenta de invertebrados bentónicos, larvas de poliquetos y moluscos bivalvos, además de crustáceos pequeños, por lo que son carnívoros (Quéro et al., 1986).



Figura 1. Distribución geográfica de la especie *Solea senegalensis* (Rodríguez et al., 2014).

Los machos de esta especie realizan un cortejo a la hembra y, posteriormente, liberan gametos y realizan la puesta. Tras el desove, los huevos dan lugar a larvas pelágicas que

poseen simetría bilateral. Después de unos 10-12 días de vida en el subsistema planctónico, experimentan una metamorfosis, que dura una semana, al cabo de la cual se transforman en juveniles asimétricos y con hábito de vida bentónico (Dinis et al., 1999). Los cambios que tienen lugar durante la metamorfosis se clasifican en cinco estadios (referidos como S0, S1, S2, S3 y S4) en función de la posición del ojo izquierdo en su proceso de migración hacia el lado derecho de la cabeza (Fernández-Díaz et al., 2001). Todos estos cambios morfológicos y fisiológicos asociados al proceso de metamorfosis están regulados por un aumento de hormonas tiroideas, ruta muy conservada en peces planos (Manchado et al., 2008; Power et al. 2008; Campinho et al. 2015). Por tanto, los procesos de síntesis y regulación de las hormonas tiroideas son de gran interés en la mejora del cultivo larvario de peces planos como el lenguado.

1.2. Avances del cultivo del lenguado y su importancia en acuicultura

Los primeros estudios relacionados con el cultivo de lenguado fueron realizados en el litoral gaditano por Rodríguez (1984) y en los estuarios portugueses por Dinis (1986). Sin embargo, no tuvieron continuidad por la prioridad que se le dio al desarrollo del cultivo de otras especies (Rodríguez et al., 2014).

El lenguado senegalés se consideró una especie adecuada en acuicultura para el área suratlántica peninsular, ya que se había cultivado tradicionalmente en esa área geográfica en sistemas extensivos y se comenzaron a desarrollar estudios sobre el cultivo de esta especie, que se centraron principalmente en la reproducción (Cañavate, 2005).

En los primeros años, los reproductores salvajes no obtuvieron puestas en diversas instalaciones. La excepción se produjo en las instalaciones de IFAPA Centro El Toruño (El Puerto de Santa María) en el año 1991. Este Centro, ha liderado la investigación e innovación para la cría en cautividad de esta especie en el ámbito nacional y europeo. Durante diez años, investigadores han coordinado y participado en los planes nacionales de cultivos marinos (Jacumar), relacionados con el desarrollo industrial del lenguado, abordando problemáticas de producción muy concretas para conseguir la explotación comercial de esta especie (Junta de Andalucía, 2015). De esta forma, se ha producido un avance tecnológico en el ciclo integral de cultivo de esta especie según lo descrito en Cañavate (2013). Sin embargo, todavía se necesitan investigaciones futuras para

mejorar algunos aspectos como: el control de la reproducción en cautividad (Morais et al., 2014), el desarrollo de protocolos de reproducción artificial, las patologías que pueden presentar durante el engorde, las malformaciones y la mortalidad, entre otros.

La importancia del lenguado en acuicultura no sólo se debe a los avances obtenidos para el cultivo de esta especie en las últimas décadas, sino además, a la necesidad de diversificación de los mercados europeos (superproducción de dorada y lubina) y a su buena aceptación en los mercados nacionales e internacionales (Morais et al., 2014). En 2015, se produjeron 664 toneladas de lenguado en España, un 20.5 % más que en 2014. Esta producción se localiza en Galicia (58.4%), Andalucía (37.2%) y Canarias (4.4%) (Fig. 2) (APROMAR, 2016).

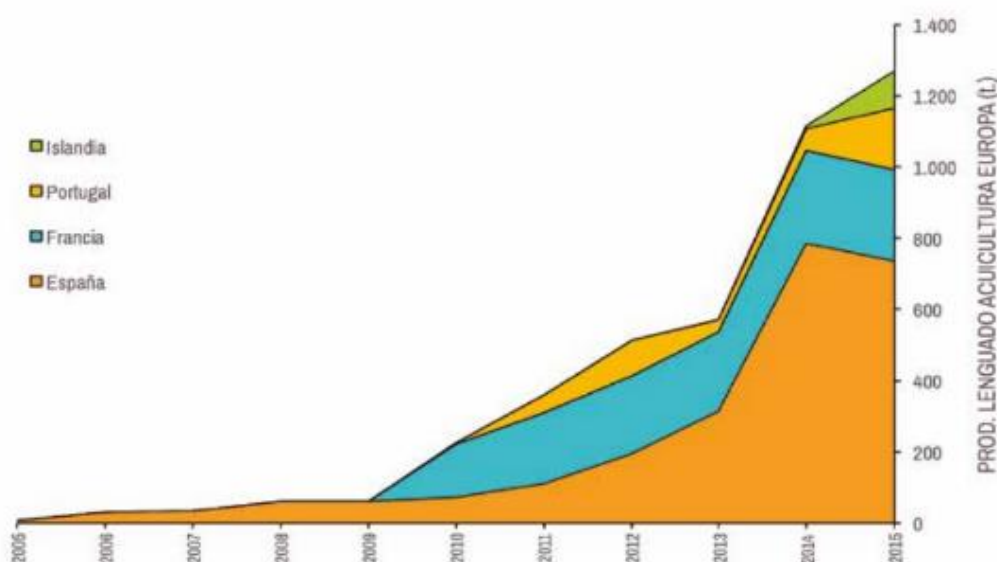


Figura 2. Evolución de la producción acuícola de lenguado senegalés (*Solea senegalensis*) en Europa para el período 2005-2015 (APROMAR, 2015).

1.3. Desarrollo larvario de lenguado en acuicultura

Los lenguados realizan dos puestas al año, una en diciembre y otra en marzo (Rodríguez et al., 2014). Normalmente, el desove y posterior fertilización ocurre durante la noche (Cañavete et al., 2007), razón por la que las puestas son recogidas por la mañana. Para ello, se habilitan unos concentradores de huevos que se denominan recolectores de doble casco, conectados en el desagüe superior de los tanques. Estos concentradores poseen una malla de 0.5 mm de luz que permite retener la totalidad de los huevos producidos. El huevo de *S. senegalensis* tiene un diámetro poco variado, de 1 mm aproximadamente. El huevo con potencial de viabilidad es transparente y presenta

numerosas y pequeñas gotas de grasa como rasgo más característico. Por el contrario, los huevos no viables aparecen opacos al ser observados en el microscopio. Generalmente, se cumple la regla de que los huevos flotantes están fecundados en su mayoría. De esta manera, resulta fácil separar ambos tipos de huevos. Esta técnica también es útil para estimar por volumetría la cantidad de huevos recogidos. Se suele trabajar con un factor de conversión de 1000 huevos por cada ml. El desarrollo embrionario suele tardar 48 h a una temperatura de 20 °C.

Tras la eclosión, las larvas de *S. senegalensis* se alimentan del saco vitelino rico en nutrientes. Posteriormente, comienzan a alimentarse de rotíferos desde 3 hasta 9 días después de la eclosión (dde) (Cañavete et al., 2007). A partir de 7 dde, además de rotíferos se alimentan con *Artemia* metanauplio y a partir de 10 dde hasta el final de la metamorfosis solo se alimenta de esta (Ribeiro et al. 1999). Cada vez que se añade el alimento a las larvas, se añade en cada tanque dos tipos de microalgas, *Isochrysis galbana* (T-iso) y *Nannochloropsis gaditana* (B3), según lo establecido en el protocolo para el cultivo de *S. senegalensis* por Fernández-Díaz et al. (2001).

Sin embargo, uno de los inconvenientes de usar rotíferos como alimento en las primeras fases del desarrollo de larvas de peces en acuicultura es que presentan un nivel considerablemente más bajo de minerales que los copépodos, su presa natural. (Hamre et al., 2008a). Los rotíferos parecen contener muchos minerales a concentraciones bajas y posiblemente deficientes. El mineral encontrado con la mayor diferencia, y por lo tanto, potencialmente el más deficiente en rotíferos fue el selenio (Se). Los niveles de selenio en rotíferos ($0.08\text{-}0.09\text{ mg}\cdot\text{kg peso seco}^{-1}$, PS) es aproximadamente 30 veces menor que el nivel de copépodos ($2\text{-}5\text{ mg}\cdot\text{kg PS}^{-1}$) y es de 3 a 8 veces menor que los requeridos para peces juveniles (Hamre et al., 2008a; Penglase et al., 2011; Ribeiro et al., 2011). Investigaciones previas han demostrado que los rotíferos con dietas de composición nutricional semejante a la de los copépodos, pueden producir aumentos sustanciales en la calidad de las larvas de los peces. Por ejemplo, se ha alterado la composición lipídica de los rotíferos para imitar mejor la composición lipídica de los copépodos (van der Meeren et al., 2008), y así aumentar el éxito de la cría de larvas para numerosas especies de peces marinos (Rainuzzo et al., 1997; Rodríguez et al., 1997; Park et al., 2006).

1.4. El selenio como nutriente esencial en peces marinos

El Se es un oligoelemento esencial para la salud de vertebrados incluyendo peces. (Doucha et al., 2009). Además, tiene un papel importante en la regulación de las hormonas tiroideas y en los sistemas de defensa antioxidante (Köhrle et al., 2005). Sin embargo, el Se también puede llegar a ser tóxico y si los niveles de Se acumulado en el cuerpo exceden los requerimientos nutricionales pueden causar grandes daños en los organismos (Fordyce, 2013). El Se presenta un estrecho margen entre la esencialidad y la toxicidad y se vuelve tóxico para los peces a un nivel ligeramente elevado más allá de la ingesta óptima. Los peces requieren concentraciones en la dieta de 0.1-0.5 $\mu\text{g Se g}^{-1}$ (peso seco) para mantener su crecimiento normal y sus funciones fisiológicas; Sin embargo, el selenio se bioacumula rápidamente y causa toxicidad a los peces cuando la concentración de la dieta alcanza valores $\geq 3,0 \mu\text{g Se g}^{-1}$ (peso seco) (Hamilton, 2004; Lemly, 1997).

Tanto la biodisponibilidad del Se como su toxicidad, depende de la forma química en que se encuentre presente. De manera natural, el Se existe de forma inorgánica (selenita) y orgánica (selenometionina), siendo la selenometionina la forma predominante de selenio en la dieta natural de los peces (Andrahennadi et al., 2007; Fan et al., 2002; Maher et al., 2010). La selenometionina (SeMet) y la selenocisteína (Se-Cys) difieren de la metionina y de la cisteína respectivamente, al contener un átomo de Se en lugar del átomo de azufre. Mientras que Se-Cyst difiere enormemente en la química a la cisteína (Johansson et al., 2005), la Se-Met comparte la química similar a la metionina (Kohrle et al., 2005). El ARN transferente no distingue entre metionina y Se-Met, y por tanto ambos se incorporan fácilmente en proteínas en posiciones de metionina. Esto explica por qué la Se-Met tiene una mayor retención (Rider et al., 2009) y es más biodisponible que la selenita en los peces (Wang et al., 1997). Por tanto, la comprensión de la toxicidad, biodisponibilidad y asimilación del Se es solo posible a través de los análisis de especiación en lugar de la determinación de Se total.

Aunque el Se es el mineral más deficiente de los rotíferos (Penglase et al., 2010), puede enriquecerse hasta los niveles de copépodos (Bell and Cowey, 1989; Penglase et al., 2011). Se ha confirmado que el rotífero *Brachionus sp.* enriquecido con selenio mediante la alimentación de *Chlorella vulgaris* mostró una reproducción activa, con

altas tasas de crecimiento de la población y la producción de huevos en reposo (Kim et al., 2014). Actualmente, existen varios protocolos de enriquecimiento de rotíferos con Se (Nordgreen et al., 2013; Penglase et al., 2011; Ribeiro et al., 2011); sin embargo, estos estudios previos no prestan atención a la especiación del selenio. Asimismo, investigaciones recientes han demostrado que la deficiencia de Se tiene efectos negativos sobre el crecimiento y la eficiencia de la alimentación asociados con la actividad reducida de la glutatión peroxidasa en *Salmo gairdneri* (Bell et al., 1986), *Oncorhynchus mykiss* (Hilton et al., 1980) e *Ictalurus punctatus* (Gatlin and Wilson, 1984). El selenio que es una parte integral de la glutatión peroxidasa (Lavander and Burk, 1994), es altamente activo en la protección celular de la oxidación por los radicales libres (Wang et al., 1997), y se requiere para el normal crecimiento y la función fisiológica de los peces (Bedwal et al., 1994). Los niveles de hormona tiroidea también fueron mayores en el grupo de selenio (Ribeiro et al., 2012).

1.5. Objetivos

El Objetivo General de este Trabajo Fin de Grado es determinar el papel del Se en la fase inicial del cultivo de larvas de *S. senegalensis*. Para ello, este Objetivo General se ha dividido en 3 Objetivos Específicos:

1. Conocer los niveles de incorporación de Se, así como su especiación, en los rotíferos enriquecidos con selenita en función del tiempo de exposición.
2. Conocer los niveles de incorporación de Se en las larvas de *S. senegalensis* cuando son alimentadas con rotíferos enriquecidos en Se durante los primeros días de cultivo (3-9 dde).
3. Analizar los efectos de los tratamientos experimentales en el rendimiento del cultivo larvario de *S. senegalensis*. Evaluar el análisis de expresión de la tg.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Protocolo de enriquecimiento de rotíferos

Los rotíferos (*Brachionus plicatilis*) procedentes del Centro IFAPA El Toruño se enriquecieron con 2 mg de Se(IV) por millón de rotíferos. Se establecieron 3 grupos experimentales: sin enriquecer con Se(IV) (Control); enriquecidos con Se(IV) durante 3h (Se(IV) 3), y enriquecidos con Se(IV) durante 24 h (Se(IV) 24). Para ello se sembraron a una densidad inicial de 250 rotíferos ml⁻¹ en tubos de 15 L (Fig. 3). Todos los grupos experimentales se enriquecieron con 250 mg por millón de rotíferos de ORI-GREEN (SKRETTING, France) durante 3 h antes de su suministro a las larvas. A continuación, se indica la cantidad de rotíferos que se enriqueció para cada día de cultivo de la larva, así como la cantidad de Se(IV) y ORI-GREEN suministrada a cada grupo experimental (Tabla 1).

Tabla 1. Enriquecimiento de rotíferos con Se(IV) y ORI-GREEN. Se indica el número de rotíferos que se han sembrado por tubo en un determinado volumen (L), la cantidad de Se(IV) añadida por tubo (mL) y la cantidad de ORI-GREEN que hay que añadir a cada tubo.

Día de cultivo (dde)	Rotíferos por tubo	Se(IV) por tubo (ml)	ORI-GREEN por tubo (g)
3	400.000 (1,6 L)	0,8	0,1
4	800.000 (3,2 L)	1,6	0,2
5	1.200.000 (4,8 L)	2,4	0,3
6	1.600.000 (6,4L)	3,2	0,4
7	2.400.000 (9,6 L)	4,8	0,6
8	2.800.000 (11,2 L)	5,6	0,7
9	3.200.000 (12,8 L)	6,4	0.8

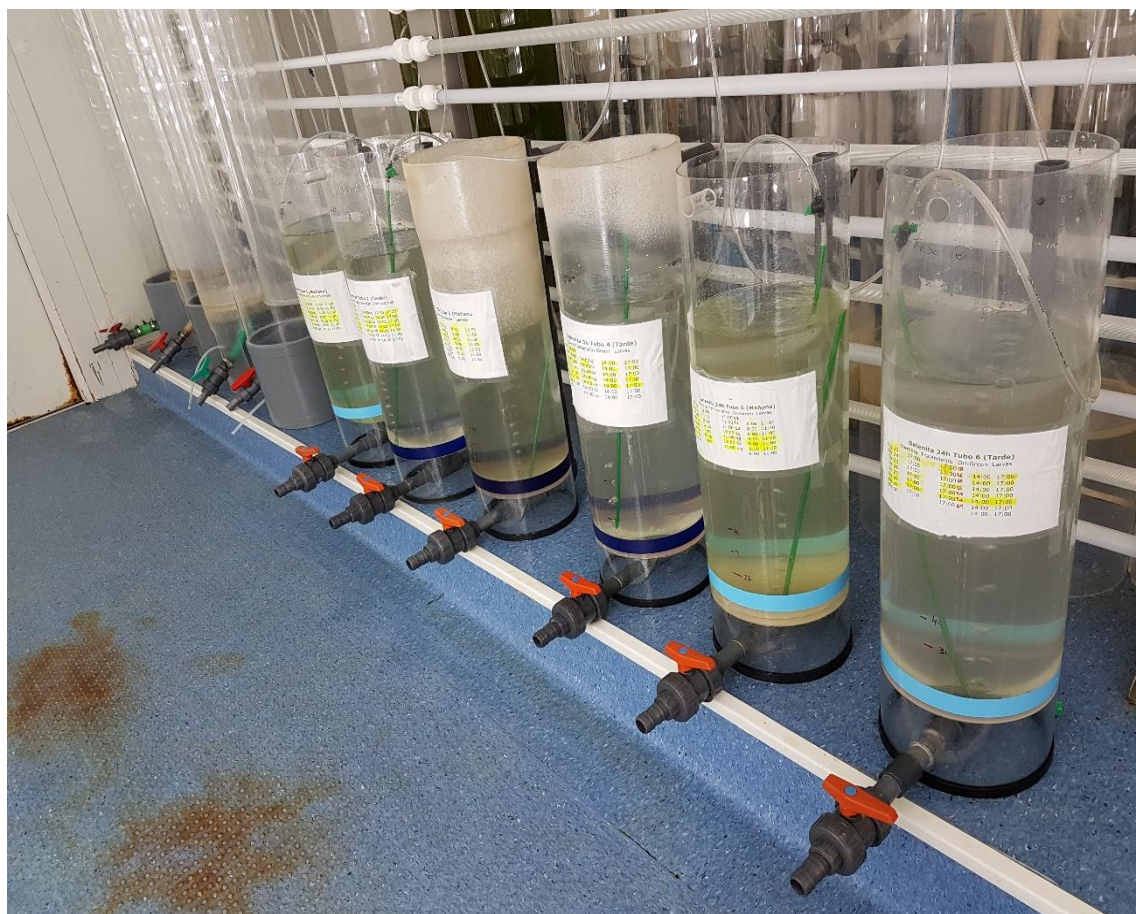


Figura 3. Tubos de 15L utilizados para el enriquecimiento de rotíferos con Se(IV) y ORI-GREEN.

2.2. Cría larvaria y protocolo de alimentación

Los embriones se obtuvieron de una puesta única del lote de reproductores de *S. senegalensis* del Centro IFAPA El Toruño (8/2017). Previamente a la incubación de los huevos viables, se separaron los huevos flotantes y no flotantes, evitando así la introducción en el incubador de huevos no viables, que deteriorarían la calidad del agua. El método que se utilizó para separar ambos tipos de huevos consistió en decantar en probetas aquellos huevos que no eran viables. Se añadió salmuera hasta llevar la salinidad a 38 ppt (salinidad de los tanques reproductores estaban a 36 ppt). Posteriormente, los embriones se incubaron a una densidad de 1.000 embriones L⁻¹ en tanques cilindro-cónicos de 80 L de circulación abierta con aireación (35ppt/22°C). La tasa de eclosión se calculó realizando cuatro conteos al azar en un vaso de precipitado de volumen de 100 ml, se hizo una media y una proporción para ver las larvas que había en un volumen de 80000 ml (capacidad del tanque). Una vez conocido el número de larvas totales, la tasa de eclosión es la división del número total de larvas entre los

huevos fecundados por 100. La tasa de eclosión de la puesta fue del 79 %, este parámetro es una estima de la viabilidad de las puestas.

Las larvas se trasladaron a 9 tanques (3 replicados por cada tratamiento) de 80 L a una densidad inicial de 70 larvas L⁻¹ 2 días después de la eclosión (dde). Los tanques están situados en una microsala aclimatada a 20 °C, que es el lugar donde se llevó a cabo el experimento. Esta microsala consta de tres secciones, en cada sección encontramos tres tanques con condiciones diferentes (dos tanques con tratamiento y un tanque con control) (Fig. 4).

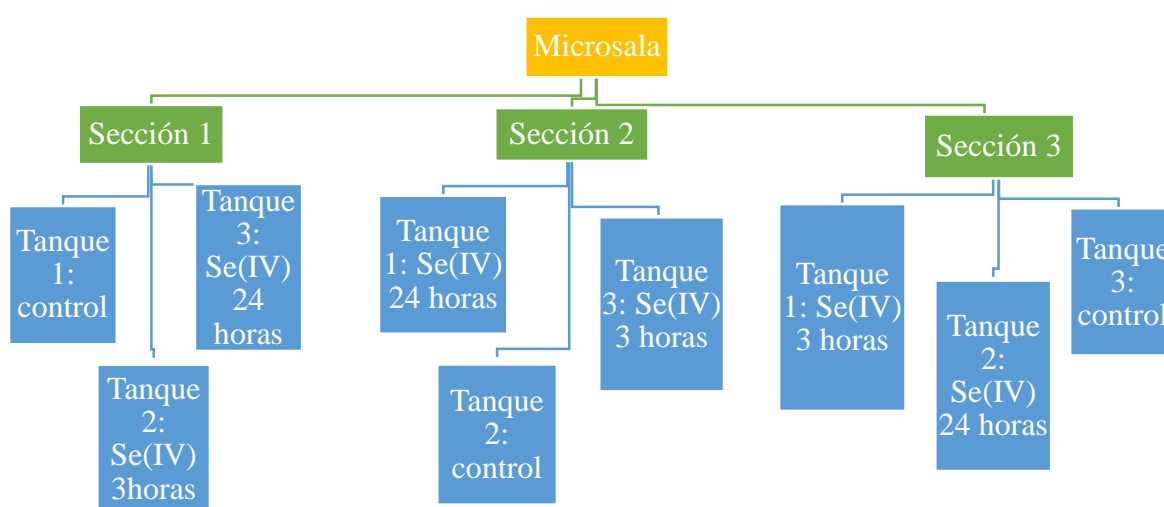


Figura 4. Esquema simplificado de las distintas condiciones para realizar el experimento.

La microsala (Fig. 5) posee un sistema de recirculación de agua, donde los tanques tienen cada uno su entrada y salida individualizada. El agua que sale se filtra mediante un filtro biológico para eliminar el amoníaco o los nitratos mediante bacterias. Posteriormente, llega a un reservorio, y de aquí, pasa a una luz ultravioleta para desinfectar el agua. Finalmente, vuelve al tanque. Todos los días se tomaron medidas de los parámetros de temperatura, salinidad y oxígeno disuelto para llevar un control de la calidad del agua.



Figura 5. Microsala donde se llevó a cabo el experimento.

Una vez que las larvas abren la boca (3 dde) se establece un fotoperiodo entre 400 y 500 lx. Las larvas se alimentaron con las dietas de los tres grupos experimentales de rotíferos desde 3 dde hasta 6 dde y se co-alimentaron con *Artemia* desde 7 dde hasta 9 dde (Fig. 6).

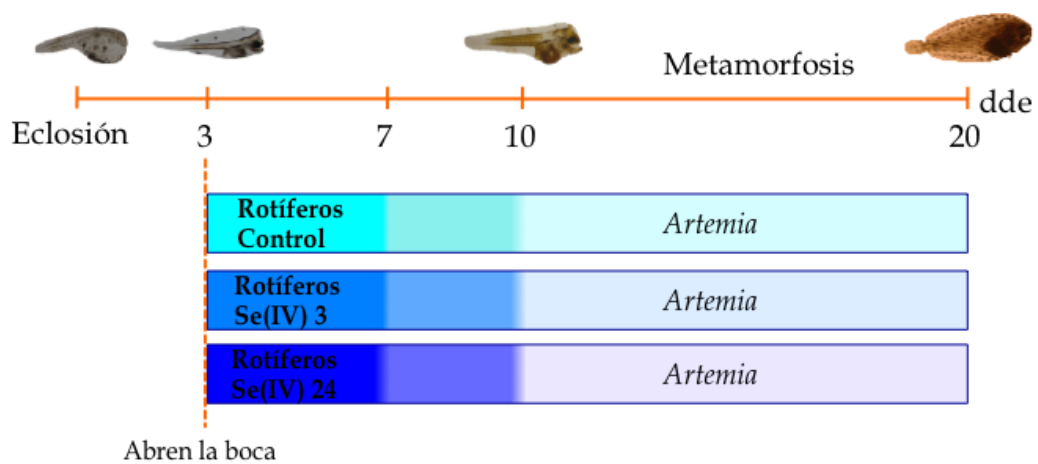


Figura 6. Esquema del régimen de alimentación de la larva *S. senegalensis*. (Ponce et al., 2017)

Asimismo, entre 3 y 9 dde, cada vez que se añadía el alimento a las larvas, se añadió en cada tanque dos tipos de microalgas (Fig. 7), *Isochrysis galbana* (T-iso) y *Nannochloropsis gaditana* (B3), según lo establecido en el protocolo para el cultivo de *S. senegalensis* por Fernández-Díaz et al. (2001).



Figura 7. Microalgas *Isochrysis galbana* (T-iso) y *Nannochloropsis gaditana* (B3), usadas para los tanques de las larvas durante el experimento.

Los rotíferos se añadieron dos veces al día a cada tanque. La concentración final de rotíferos en cada tanque aumentó desde 2,5 hasta 20 ind·ml⁻¹. A partir de 7 dde hasta el final de la metamorfosis, las larvas se alimentaron con *Artemia metanauplii* (Tabla 2). Para mantener constante las concentraciones de presa viva en cada tanque, todos los días se llevó a cabo el conteo del excedente de rotíferos y artemia mediante tres tomas de agua al azar de cada tanque.

Tabla 2. Protocolo de alimentación. Se indica el número de rotíferos mL⁻¹ y de Artemia mL⁻¹ que se añadió a cada tanque según el día de desarrollo de la larva de lenguado.

Día después de la eclosión (dde)	Rotíferos mL ⁻¹	Artemia mL ⁻¹
3	2,5	
4	5	
5	7,5	
6	10	
7	12,5	1
8	17,5	1
9	20	1
10		3
11		3
12		3
13		4
14		4
15		4
16		4
17		4
18		5
19		5
20		5
21		5
22		5

2.3. Determinación de selenio total y especiación

Las muestras de rotíferos para los análisis de selenio total y especiación (n = 4) se tomaron en diferentes días del cultivo larvario de lenguado. Asimismo, se tomó muestras de huevos y larvas 3, 6, 9, 15 y 21 dde. Para ello, se filtraron y se lavaron con agua de mar autoclavada y, posteriormente, con agua destilada. Una vez filtrados, se pasaron con una espátula a un eppendorf de 1,5 mL, se congelaron con nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta su posterior análisis.

Los análisis de selenio total y la especiación se llevaron a cabo en el Departamento de Química y Ciencias de los Materiales de la Universidad de Huelva. Brevemente, para Se total, se llevó a cabo mediante espectrometría de plasma con detector de masa (ICP-MS) con celda de colisión (Agilent 7700 ICP-MS, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) y por FIA-TR-UV-HG-AFS después de una digestión ácida de las muestras.

2.4. Crecimiento larvario y progreso de la metamorfosis

2.4.1. Peso Seco (PS)

Las muestras de larvas para peso seco se tomaron 2, 5, 10, 14 y 20 dde. En primer lugar, se lavaron los cubreobjetos con agua destilada y se dejaron secar en la estufa durante 24 horas. A continuación, se atemperaron 1 hora en un desecador y se pesaron en la balanza de precisión. Posteriormente, las larvas se anestesiaron con metanosulfonato de tricaína (MS-222, Tricaine-S®, Western Chemical Inc.), se filtraron y se lavaron con agua de mar, agua del grifo, y finalmente, con agua destilada, para eliminar los restos de sal. Una vez lavadas, se colocaron en los cubreobjetos eliminando el exceso de agua. Se secaron en una estufa a 60°C durante 48 horas. Finalmente, después de 1 hora en el desecador se pesaron.

El peso por larva se determinó mediante la diferencia entre el peso con larva y el peso sin larva entre el número de larvas del portaobjetos.

$$PS = \frac{\text{Peso con larvas} - \text{Pesosinlarvas}}{n^{\circ} \text{ larvas}}$$

2.4.2. Tasa de crecimiento específica (SGR)

La tasa de crecimiento específica se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$SGR = \frac{\ln PS_f - \ln PS_i}{DDE_f - DDE_i}$$

donde:

- PS_f es el peso seco final.
- PS_i es el peso seco inicial.
- DDE_f es el día después de la eclosión final.

- DDE_i es el día después de la eclosión inicial.

2.4.3. Índice metamórfico

Una vez tomada la muestra de cada tanque, éstas se anestesiaron con MS-222. En la lupa se observó el estadio en el que se encontraba la larva según la migración del ojo descrito por Fernández-Díaz et al. (2001) (Fig. 8).

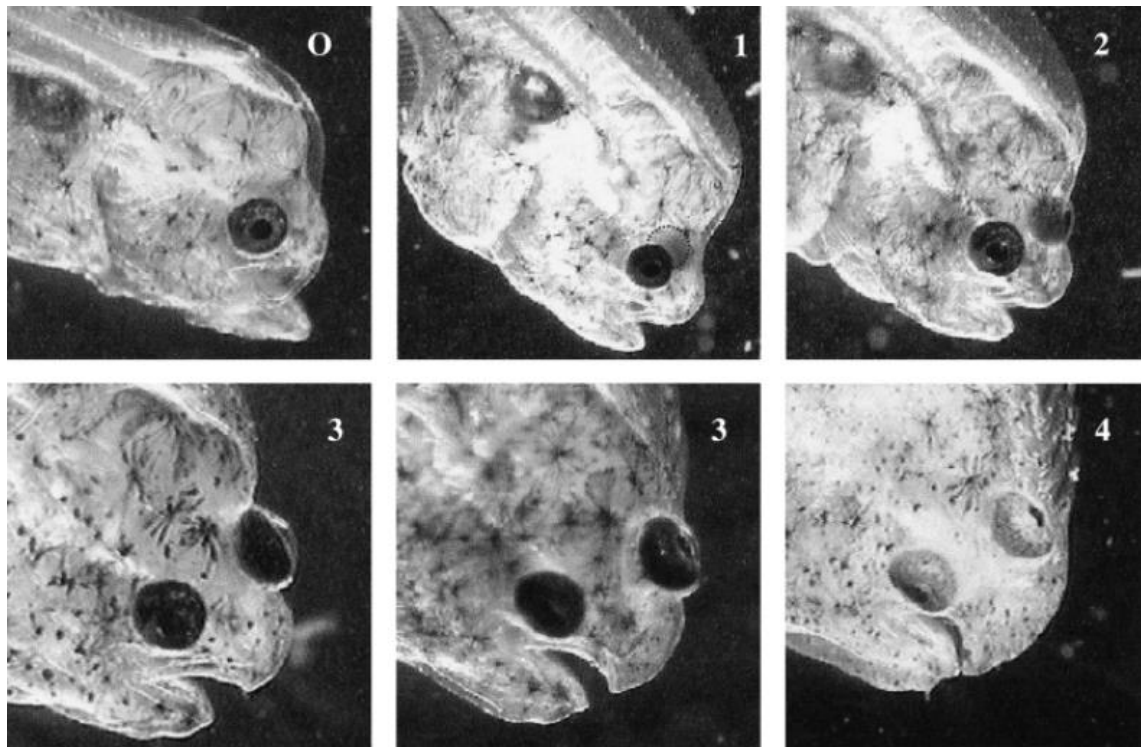


Figura 8. Posición del ojo en los distintos estadios de la metamorfosis de la larva *S. senegalensis*. Fernández-Díaz, et al. (2001).

El índice metamórfico se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$IM = (S0*0 + S1*1 + S2*2 + S3*3 + S4*4) / n^{\circ} \text{ individuos}$$

Donde S0, S1, S2, S3 y S4 son los estadios de la metamorfosis.

2.5. Extracción de ARN y análisis de la expresión génica

En primer lugar, las larvas se separaron por estadios larvarios para obtener la muestra necesaria. Se llevó a cabo la homogenización de las larvas utilizando Lysing Matrix D

(Q-BioGene) en el FastPrep FG120 (Bio101) durante 40 s a $6 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$. A continuación, se aisló ARN utilizando el kit RNeasy Mini Kit (Qiagen) según el protocolo del fabricante. En todos los casos, las muestras de ARN se trataron 2 veces con DNase I durante 30 min usando el kit RNase-Free DNase (Qiagen). La comprobación de la integridad de las muestras de ARN se llevó a cabo mediante electroforesis en gel de agarosa. Asimismo, se cuantificaron mediante NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific).

La síntesis de cDNA se llevó a cabo a partir de 1 μg de ARN mediante el kit iScript™ cDNA Synthesis (Bio-Rad). Finalmente, los análisis de qPCR se llevaron a cabo mediante CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 10 μl incluyendo el cDNA generado a partir de 10 ng de ARN, 200 nM de cada cebador específico y 5 μL de SYBR® Premix Ex Taq™ (Takara). El protocolo de amplificación fue el siguiente: desnaturalización inicial y activación de la enzima durante 30 s a 95°C , seguido de 40 ciclos de 95°C durante 5 s y 60°C durante 30 s. Cada ensayo se llevó a cabo por duplicado. Se utilizaron como genes de referencia *ubiquitina* (*ub*) y *gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa* (*gapdh*) (Infante et al., 2006) de los cuales se realizó una media geométrica. Se usaron cebadores específicos correspondientes a la *tiroglobulina* (*tg*) (Manchado et al. 2008). La expresión relativa de ARNm se calculó mediante el método $2^{(-\Delta\Delta\text{Ct})}$ (Livak y Schmittgen, 2001).

2.6. Análisis estadístico

Antes de llevar a cabo el análisis estadístico, se comprobó que todos los datos seguían la normalidad mediante el análisis Kolmogorov-Smirnov. En los casos en los que no se cumplía la normalidad, se llevó a cabo una transformación logarítmica de los datos.

Los datos de peso seco, SGR, índice metamórfico y expresión génica se expresaron como media \pm SD y se analizaron utilizando una ANOVA de una vía seguido del post-hoc Tukey cuando se detectaron diferencias significativas. Para los datos del contenido de Se total en larvas se llevó a cabo un ANOVA de doble vía, considerando como factores el tiempo y el tratamiento. En todos los casos, se utilizó el programa SPSS v21.

3. RESULTADOS

3.1. Se total en rotíferos

El contenido de Se total en los rotíferos antes del enriquecimiento estuvo por debajo del límite de detección. El contenido de Se total en los rotíferos enriquecidos con Se(IV) y ORI-GREEN se indica en la Figura 9. Se observó que los rotíferos del grupo Se(IV) 24 presentaron un mayor contenido de Se total seguido de los rotíferos del grupo Se(IV) 3. De esta forma, el contenido de Se total fue 7 y 43 veces mayor en los rotíferos Se(IV) 3 y Se(IV) 24 que en los rotíferos del grupo control, respectivamente. En el control existe una pequeña cantidad de selenio debido al ORI-GREEN usado para alimentarlos.

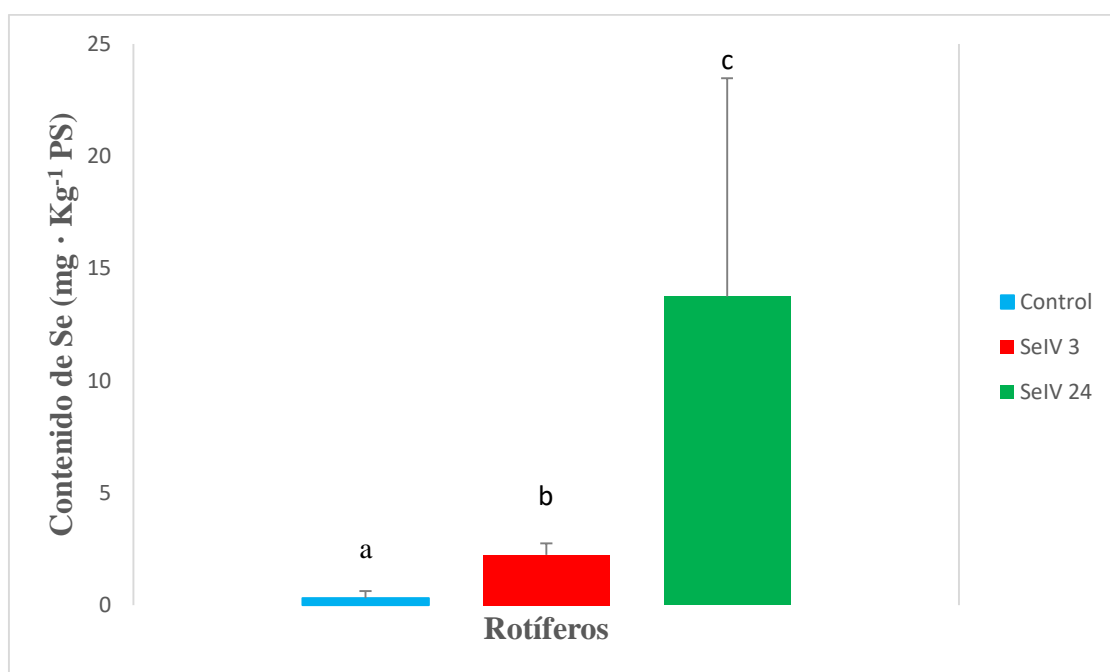


Figura 9. Contenido de Se total en los rotíferos usados para alimentar a las larvas. Diferentes letras indican diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos ($p < 0,05$).

Los resultados de especiación detectaron la presencia de selenometionina (SeMet) y Se-metil selenocisteína (SeMetSeCys), mientras que en los rotíferos Se(IV) 3 no se detectó su presencia.

3.2. Se total en larvas

El contenido de Se total en las larvas de lenguado a lo largo de la fase experimental se indica en la Figura 10. Se observó un descenso significativo del mismo 9 dde en todos los grupos experimentales. Sin embargo, los niveles de Se total en las larvas alimentadas con rotíferos del grupo Se(IV) 3 fueron significativamente más bajos que en las larvas del grupo control.

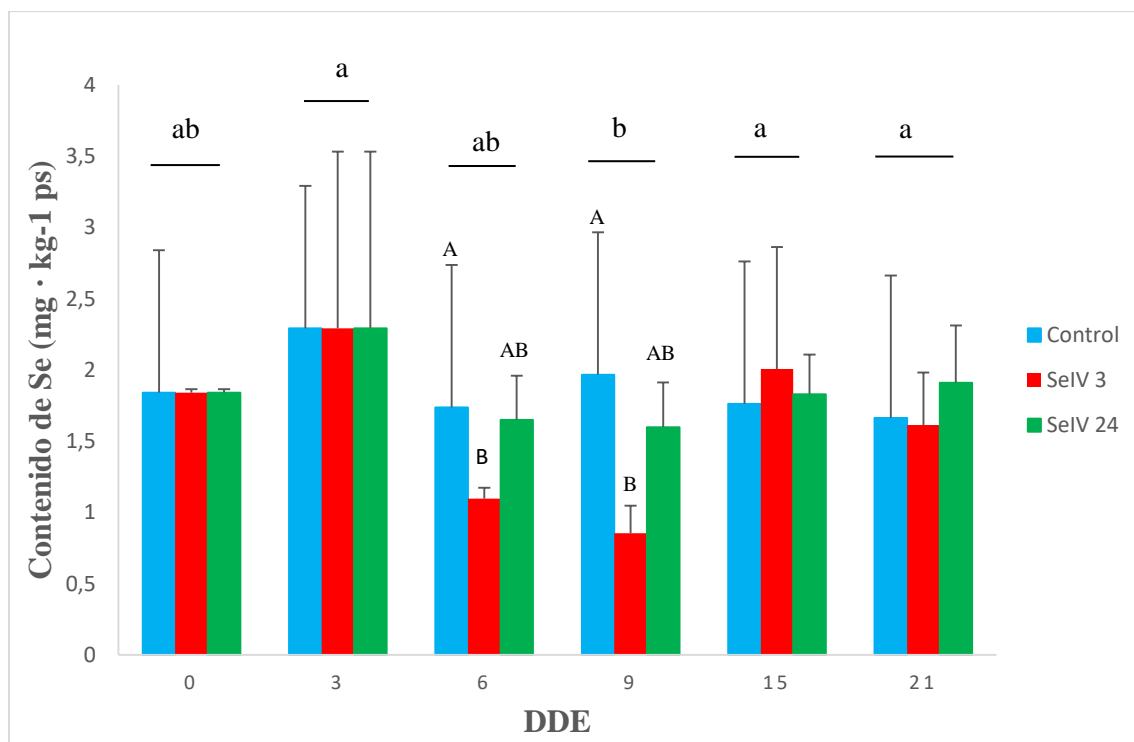


Figura 10. Contenido de Se total (mg Se Kg⁻¹ PS) en larvas de lenguado alimentadas con rotíferos enriquecidos con Se(IV). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos (mayúscula) o la edad (minúscula) ($p < 0,05$).

3.3. Rendimiento larvario

El crecimiento larvario determinado por el peso seco se indica en la Figura 11. No se observaron diferencias significativas entre los grupos experimentales en ningún caso. Sin embargo, cuando se analizaron los datos de SGR (Tabla 3), se observó que fue significativamente mayor en las larvas alimentadas con rotíferos Se(IV) 24 en el período pre-metamórfico (2-5 dde) ($p < 0,05$).

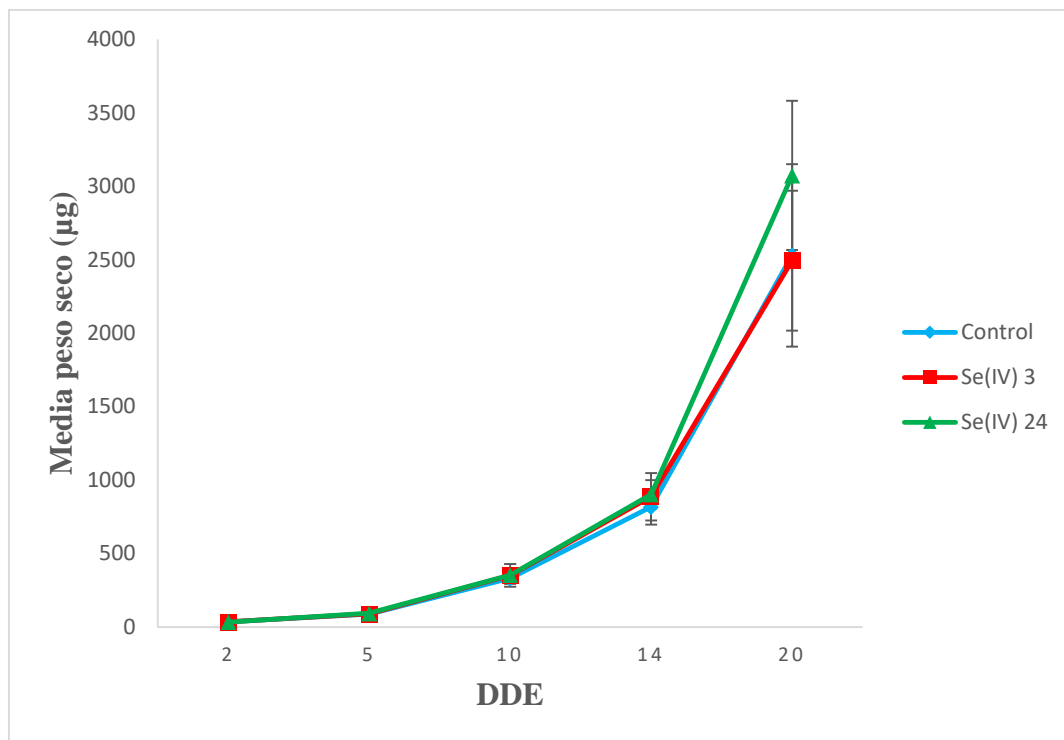


Figura 11. Crecimiento (PS) de las larvas de lenguado alimentadas con rotíferos enriquecidos con Se(IV).

Tabla 3. Tasa específica de crecimiento (SGR) para cada grupo experimental durante 5 períodos diferentes. Cada valor está expresado como la media \pm SD. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0,05$).

TASA ESPECÍFICA DE CRECIMIENTO (SGR)			
PERÍODO	Grupos experimentales		
	Control	Se(IV) 3h	Se(IV) 24h
2-5 DDE	0,30 \pm 0,02 ^a	0,31 \pm 0,02 ^a	0,34 \pm 0,02 ^b
5-10 DDE	0,26 \pm 0,02	0,27 \pm 0,05	0,26 \pm 0,03
10-14 DDE	0,22 \pm 0,01	0,23 \pm 0,02	0,23 \pm 0,01
14-20 DDE	0,21 \pm 0,03	0,19 \pm 0,02	0,23 \pm 0,02
2-20 DDE	0,24 \pm 0,02	0,24 \pm 0,01	0,26 \pm 0,01

Los resultados obtenidos para el progreso de la metamorfosis determinado según la migración del ojo, se muestra en la Figura 12. Las larvas alimentadas con los rotíferos de los grupos Se(IV) 3 y Se(IV) 24 comenzaron antes el proceso de metamorfosis y la llevaron a cabo de manera más rápida que las larvas alimentadas con los rotíferos de los grupos controles ($p < 0,05$). El 100 % de las larvas estuvieron en el estadio S4 en todos los casos 17 dde.

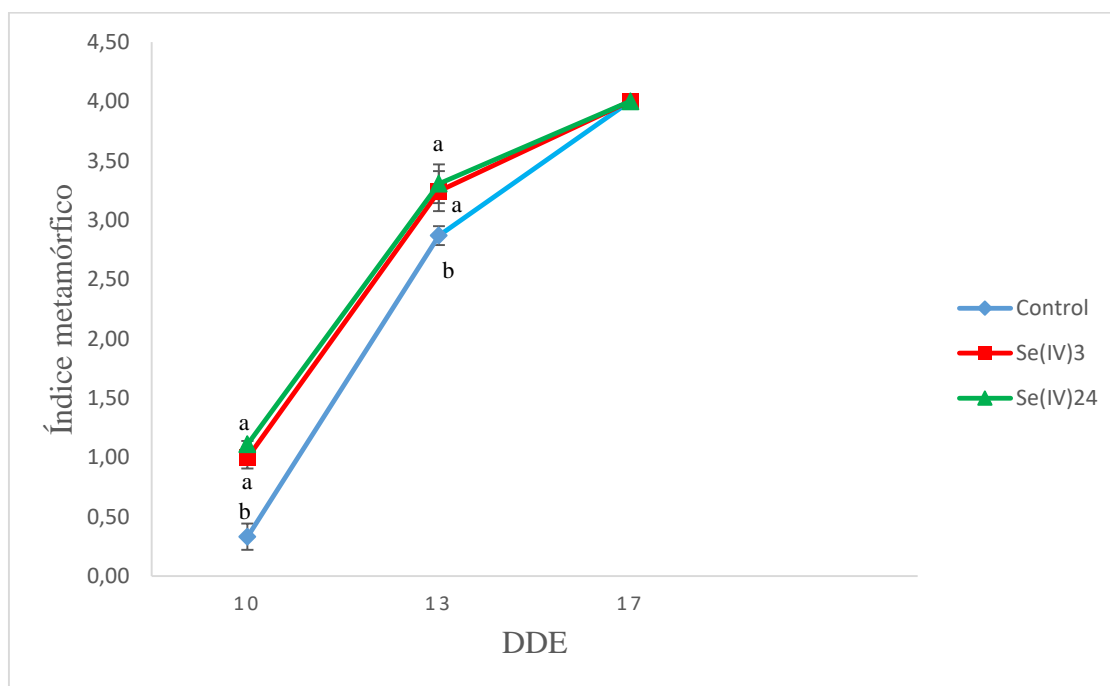


Figura 12. Índice metamórfico de las larvas de lenguado alimentadas con rotíferos enriquecidos con Se(IV). Diferentes letras indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0,05$).

3.4. Expresión génica

En base a los resultados obtenidos y debido a la implicación del Se en la regulación de las hormonas tiroideas y el papel de éstas en el proceso metamórfico, se llevaron a cabo análisis de expresión de *tg* (Fig. 13), molécula precursora T4. En las larvas alimentados con rotíferos Se(IV) 24 los niveles de expresión de *tg* aumentaron significativamente con respecto a las larvas alimentadas con rotíferos de los grupos control y Se(IV) 3 cuando estaban en los estadios metamórficos S1 y S2.

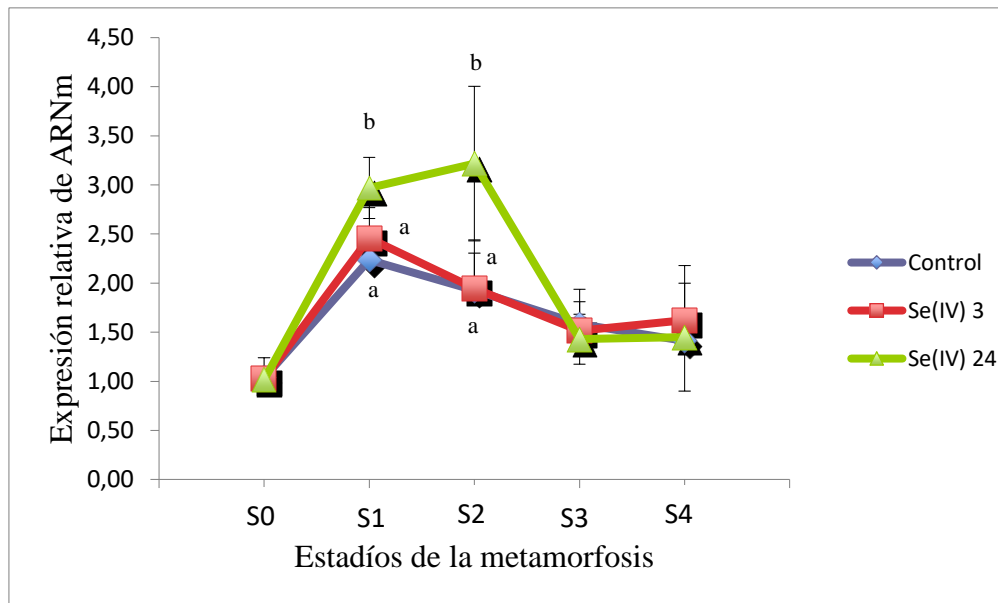


Figura 13. Expresión génica relativa de *tg* durante el desarrollo de las larvas de *S. senegalensis* alimentadas con rotíferos enriquecidos con diferentes niveles de Se (Control, Se(IV) 3 y Se(IV) 4). Los valores de expresión se normalizaron con los obtenidos para *gapdh2* y *ub*. Diferentes letras indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0,05$).

4. DISCUSIÓN

En acuicultura, las larvas de peces normalmente se alimentan de rotíferos y *Artemia* durante los primeros estadios del desarrollo (Ribeiro et al. 1999). Sin embargo, los niveles de varios nutrientes son más bajos que en los copépodos, su presa natural. El Se es uno de estos minerales cuyos niveles son más bajos en rotíferos que en copépodos (sobre unas 30 veces menos) (Hamre et al. 2008b).

En los últimos años, se han llevado a cabo varias investigaciones sobre el enriquecimiento de rotíferos con Se como una manera de satisfacer las necesidades nutricionales de las larvas de peces marinos (Penglase et al., 2011; Ribeiro et al., 2011). La mayoría de estos estudios utilizan levadura selenizada, una mezcla de selenocompuestos producidos por la levadura (principalmente *Saccharomyces cerevisiae*) como fuente de Se. En este caso, la forma predominante es SeMet, representando el 70 % de la masa total (Bierla et al., 2012). La forma química del Se suministrado así como la concentración ensayada afecta a su biodisponibilidad y por tanto al impacto en el organismo. En este Trabajo Fin de Grado, se ha usado la Se(IV) (forma inorgánica de selenio) para el enriquecimiento de los rotíferos. En cada tanque se usaron unas condiciones diferentes: i) un tanque control (no enriquecido con selenita), ii) otro enriquecido con Se(IV) durante 3 horas, y iii) otro con Se(IV) durante 24 horas, ambos a una concentración de 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ y una densidad de 250 rotíferos mL^{-1} . En los resultados obtenidos, se apreció una mayor acumulación de Se total en los rotíferos enriquecidos con selenita, de forma, que en los rotíferos Se(IV) 3 se obtuvieron niveles de Se total similares a los niveles observados en copépodos. Sin embargo, en los rotíferos del grupo Se(IV) 24, los niveles de Se total (13,75 $\text{mg}\cdot\text{KgPS}^{-1}$) fueron 5 veces más altos a los observados en copépodos. Además, solo se detectó la presencia de SeMet y SeMetSeCys en los rotíferos Se(IV) 24. En otros estudios previos de enriquecimiento de rotíferos con Se se utilizó una fuente orgánica, siendo los niveles de Se obtenidos 10 veces más altos que los que han sido observados en copépodos, con rangos desde 35,9 a 104,0 $\text{mg}\cdot\text{KgPS}^{-1}$ (Hamre et al., 2008b). Las diferencias observadas en los niveles de Se total con otros trabajos pueden ser debidas a la fuente de selenio empleada para enriquecer el rotífero, ya que las fuentes orgánicas son más biodisponibles (Thiry et al., 2012).

Las larvas fueron alimentadas con los rotíferos enriquecidos con las distintas condiciones experimentales. La diferencia entre tratamientos solo se observó a 6 y 9 dde, además los niveles de selenio en las larvas alimentadas con rotíferos Se(IV) 3 fueron significativamente más bajos que los controles. Gracias a estudios anteriores, se sabe la cantidad de Se que se necesita para un adecuado crecimiento fisiológico de la larva, además de las concentraciones que producen cierta toxicidad (Hamilton, 2004; Lemly, 1997). Los estudios en otras especies, han mostrado que la concentración de Se total en las larvas de *Gadus morhua* es significativamente mayor en larvas alimentadas con rotíferos enriquecidos con selenio (Se+levadura). De este modo, las larvas de bacalao comenzaron con una concentración de selenio de $1,78 \pm 0,02$ mg Se•kg⁻¹ PS a día 2 dde. Sin embargo, las larvas del grupo control disminuyeron la concentración a $0,88 \pm 0,02$ mg Se•kg⁻¹ PS a día 29 dde, mientras que las larvas enriquecidas aumentaron a $3,99 \pm 0,15$ mg Se•kg⁻¹ PS en el mismo período. Por este motivo, los autores llegaron a la conclusión de que las larvas enriquecidas tuvieron concentraciones de selenio 4,5 veces más altas que las de los controles a día 29 dde (Penglase et al., 2010). En nuestro experimento, las larvas comenzaron a una concentración de $1,84 \pm 0,03$ mg Se•kg⁻¹ PS el día de la eclosión, por lo que los datos no son muy diferentes al inicio del experimento de Penglase. Sin embargo, los datos de las larvas enriquecidas en nuestro experimento no llegan en ningún momento a ser tan altos, pero también presentan diferencias significativas entre los distintos tratamientos a 6 y 9 dde. En otro experimento llevado a cabo con larvas de *Pagrus major* alimentadas con rotíferos enriquecidos con Se (selenita sódica) se observó que la cantidad de Se fue mayor en las larvas alimentadas con rotíferos enriquecidos ($9,5 \pm 0,2$ µg/g ó mg/kg PS) que en los controles ($1,3 \pm 0,3$ mg/kg PS) (Kim et al., 2014). Podemos observar, como el nivel alcanzado en los rotíferos enriquecidos es 3 veces mayor que en el experimento de Panglease y mucho mayor que en el experimento que hemos realizado.

En nuestro experimento, no se observaron diferencias en el peso seco entre tratamientos. Sin embargo, se aprecian diferencias significativas en la SGR entre tratamientos en el primer periodo. Además, en el índice metamórfico se puede observar diferencias entre el control y los tratamientos de Se(IV) 3 y Se(IV) 24 ya que, en los tratamientos, se adelantó la metamorfosis comparando con el control. Según estos resultados, las larvas alimentadas con rotíferos Se(IV) 3 y Se(IV) 24 presentan un adelanto en la metamorfosis. *Solea senegalensis* empieza la metamorfosis entre 9 y 15 dde,

dependiendo del régimen de alimentación (Fernandez-Díaz et al., 2001). El inicio de la metamorfosis se determinó como el momento en que las larvas comenzaron la migración ocular. Las larvas con los tratamientos Se(IV) 3 y 24 comenzaron la metamorfosis antes que el control, ya que 10 dde ya se encuentran en el estadio S1. Sin embargo, el control se encontraba en S0.

Según estos resultados y debido a la implicación del Se en la regulación de las hormonas tiroideas y al papel de estas en los procesos metamórficos (Manchado, et al., 2008; Köhrle et al., 2005; Power et al., 2008), se decidió investigar los niveles de expresión de la *tg*, molécula precursora de T4, en los diferentes estadios metamórficos. Se ha demostrado que ingestas diferentes de Se puede influir en los niveles de hormonas tiroideas en los mamíferos (Beckett y Arthur, 2005; Kohrele et al., 2005), y se ha observado que el enriquecimiento de selenio puede aumentar la producción de T4 en larvas de lenguado (Ribeiro et al., 2011). Una vez se analizó la expresión génica, se observó un aumento significativo en los niveles de expresión de *tg* en los estadios S1 y S2 de las larvas alimentadas con rotíferos enriquecidos con Se(IV) 24 con respecto a las larvas alimentadas con rotíferos de los grupos control y Se(IV) 3. Estas diferencias en los niveles de expresión de la *tg* se podrían asociar al alto contenido en SeMet y SeMetSeCys observado en los rotíferos Se(IV) 24, ya que en los rotíferos Se(IV) 3 no se detectó su presencia a pesar de tener unos niveles de Se total similares a los observados en copépodos.

En este trabajo, se han evaluado los efectos del selenio suministrado a través de la dieta en fases tempranas del desarrollo larvario *S. senegalensis*. Los resultados obtenidos demuestran que los rotíferos son capaces de asimilar y metabolizar la selenita en selenometionina (SeMet) y Se-metil selenocisteína (SeMetSeCys) cuando el tiempo de exposición es 24 h. Los niveles de selenio en las larvas alimentadas con rotíferos enriquecidos con selenita fueron significativamente diferentes entre tratamientos solo 6 y 9 dde. Sin embargo, las larvas alimentadas con rotíferos enriquecidos realizaron la metamorfosis de manera más rápida. Los datos de expresión génica revelaron que las larvas de este grupo modifican significativamente la expresión de la *tg*. Estos resultados revelan nuevos datos sobre el papel del Se y sus especies el crecimiento y progreso metamórfico de las larvas de lenguado en fases tempranas del desarrollo.

5. CONCLUSIONES

1. Los rotíferos enriquecidos con selenita durante 24 h son capaces de metabolizarla en selenometionina (SeMet) y Se-metil selenocisteína (SeMetSeCys), mientras que en los enriquecidos con selenita durante 3 h no se detectaron estas especies de selenio, a pesar de tener niveles de selenio total similares a los observados en copépodos.
2. Los niveles de selenio total durante el desarrollo larvario de lenguado disminuyen 9 días después de la eclosión, posiblemente como consecuencia del inicio del proceso de metamorfosis, migración del ojo.
3. Se ha demostrado que el selenio, especialmente cuando se encuentra en forma de SeMet y SeMetSeCys, presenta un papel importante en el crecimiento y proceso metamórfico de las larvas de lenguado cuando se suministra en fases tempranas del desarrollo. Se ha identificado el perfil de expresión de *tg* durante el desarrollo larvario de lenguado en función de los tres grupos de rotíferos con diferentes cantidades de selenio. Un alto contenido en selenio activó la expresión de este gen, que se podría asociar con un progreso de la metamorfosis más rápido.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Bell, J.G., Cowey, C.B., 1989. Digestibility and bioavailability of dietary selenium from fishmeal, selenite, selenomethionine and selenocystine in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* 81, 61-68 pp.
- Ben-Tuvia, A., 1990. A taxonomic reappraisal of the Atlanto-Mediterranean soles *Solea solea*, *S. senegalensis* and *S. lascaris*. *Journal of Fish Biology* 36, 947-960.
- Cañavete Hors, J.P. Diversificación de especies en la piscicultura marina española. (2013). Capítulo 6: Cultivo de soleidos: el lenguado senegalés. 249-283 pp.
- Cañavete, J.P. y Anguis, V., 2007. Manual del cultivo del lenguado y otros peces planos. Capítulo 2: obtención de puestas del lenguado senegalés en cautividad. 25-30 pp.
- Dinis, M.T., Ribeiro, L., Soares, F. and Sarasquete, M.C., 1999. A review on the cultivation potential of *Solea senegalensis* in Spain and Portugal. *Aquaculture* 176, 27-38 pp.
- Doucha, J., Lívanský, K., Kotrbáček, V., Zachleder, V., 2009. Production of *Chlorella* biomass enriched by selenium and its use in animal nutrition: a review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 83, 1001-1008 pp.
- Encinar, J.R., Sliwka-Kaszynska, M., Polatajko, A., Vacchina, V., Szpunar, J., 2003. Methodological advances for selenium speciation analysis in yeast. *Analytica Chimica Acta* 500, 171-183 pp.
- Fernández-Díaz, C., Yúfera, M., Cañavete, J.P., Moyano, F.J., Alarcón, F.J., and Díaz, M., 2000. Growth and physiological changes during metamorphosis of *Senegal sole* reared in the laboratory. *Journal of Fish Biology* 58, 1086–1097 pp.
- Fordyce, F.M., 2013. Selenium Deficiency and Toxicity in the Environment. In *Essentials of Medical Geology: Revised Edition* (Springer), 375-416 pp.
- Hamre, K., Mollan, T.A., Sæle, Ø. and Erstad, B., 2008. Rotifers enriched with iodine and selenium increase survival in Atlantic cod (*Gadus morhua*) larvae. *Aquaculture* 284, 190-195 pp.
- Hamre, K., Srivastava, A., Ronnestad, L., Mangor-Jensen, A., Stoss, J., 2008. Several micronutrients in the rotifer *Brachionus sp* may not fulfil the nutritional requirements of marine fish larvae. *Aquaculture Nutrition* 14, 51-60 pp.
- Johansson, L., Gafvelin, G., Aenér, E.S.J., 2005. Selenocysteine in proteins-properties and biotechnological use. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – General subjects* 1726 (1), 1-13 pp.

- Junta de Andalucía, 2015. Los cultivos marinos como actividad de futuro. Consultado: 1/08/17. Disponible en el siguiente enlace: <http://www.juntadeandalucia.es/presidencia/portavoz/innovacion/103886/Pesca/lenguado/acuicultura>
- Kim, H., Sakakura, Y., Maruyama, I., Nakamura, T., Takiyama, K., Fujiki, H. and Hagiwara, A., 2014. Feeding effect of Selenium enriched rotifers on larval growth and development in red sea bream *Pagrus major*. *Aquaculture* 432, 273-277 pp.
- Klaren P.H.M., Wunderink Y.S., Yúfera M., Mancera J.M. and Flik G., 2008. The thyroid gland and thyroid hormones in Senegalese sole (*Solea senegalensis*) during early development and metamorphosis. *General and Comparative Endocrinology* 155: 686-694 pp.
- Koedijk, R., 2009. "Phenotypic plasticity influenced by diet during early development a comparative study an Atlantic cod." Doctoral Thesis, University of Bergen, Norway. ISBN 978-82-308-0829-0.
- Köhrle, J., Jakob, F., Contempré, B., and Dumont, J.E., 2005. Selenium, the Thyroid and the Endocrine System. *Endocrine Reviews* 26 (7), 944-984 pp.
- La Asociación Empresarial de Productores de Cultivos Marinos de España (APROMAR). (2016). Informe La Acuicultura en España 2016. Apartado 5.6.1, 33-51 pp.
- Manchado, M., Infante, C., Asensio, E., Planas, J.V. and Cañavate, J.P., 2007. Thyroid hormones down-regulate thyrotropin subunit and thyroglobulin during metamorphosis in the flatfish Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup). *General and Comparative Endocrinology* 155, 447-455 pp.
- Misra, S., Peak, D., Chen, N., Hamilton, C. and Niyogi, S., 2012. Tissue-specific accumulation and speciation of selenium in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to elevated dietary selenomethionine. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 155, 560-565 pp.
- Morais, S., Aragao, C., Cabrita, E., Conceição, L.E.C., Constenla, M., Costas, B., Dias, J., Duncan, N., Engrola, S., Estevez, A., Gisbert, E., Mañanos, E., Valente, L.M.P., Yúfera, M., and Dinis, M.T., 2014. New developments and biological insights into the farming of *Solea senegalensis* reinforcing its aquaculture potential. *Aquaculture* 6, 1-37 pp.
- Nordgreen, A., Yúfera, M., Hamre, K., 2008. Evaluation of changes in nutrient composition during production of cross-linked protein microencapsulated diets for marine fish larvae and suspension feeders. *Aquaculture* 285, 159-166 pp.
- Olivotto, L., Buttino, I., Borroni, M., Piccinetti, C.C., Malzone, M.G., Carnevali, O., 2008. The use of the Mediterranean calanoid copepod *Centropages typicus* in yellowtail clownfish (*Amphiprion clarkii*) larviculture. *Aquaculture* 284 (1-4), 211-216 pp.

- Park, H.G., Puvanendran, V., Kellet, A., Parrish, C.C., Brown, J.A., 2006. Effect of enriched rotifers on growth, survival, and composition of larval Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Journal Of Marine Science* 63 (2), 285-295 pp.
- Payne, M.F., Rippingale, R.J., Clearly, J.J., 2001. Cultured copepods as food for West Australian dhufish (*Glaucosa hebraicum*) and pink snapper (*Pagrus auratus*) larvae. *Aquaculture* 194 (1-2), 137-150 pp.
- Penglase, S., Hamre, K., Sweetman, J.W. And Nordgreen, A. (2010). A new method to increase and maintain the concentration of selenium in rotifers (*Brachionus spp.*). *Aquaculture* 315 (2011), 144-153 pp.
- Penglase, S., Nordgreen, A., van der Meeren, T., Olsvik, P.A., Sæle, Ø., Sweetman, J.W., Baevefjord, G., Helland, S., Hamre, K., 2010. Increasing the level of selenium in rotifers (*Brachionus plicatilis* 'Cayman') enhances the mRNA expression and activity of glutathione peroxidase in cod (*Gadus morhua* L.) larvae. *Aquaculture* 306, 259-269 pp.
- Power D.M., Einarsdóttir, I.E., Pittman K., Sweeney, G., Hildahl, J., Campinho, M., Silva, N., Sæle, Ø., Galay-Burgos, M., Smáradóttir H. and Björnsson, B.T., 2008. The Molecular and Endocrine Basis of Flatfish Metamorphosis. *Aquaculture* 16, 95-111 pp.
- Quéro J.C., Desoutter M. y Lagardeére F. 1986. Cynoglossidae. En: Whithead P.J.P., Bauchot M.L., Hureau J.C., Nielsen J. And Tortonese E. (Eds) *Fishes of the north-eastern Atlantic and the Mediterranean*, Volume III. Paris:UNESCO, pp. 1325-1328.
- Rainuzzo, J.R., Reitan, K.I., Olsen, Y., 1997. The significance of lipids at early stages of marine fish: A review. *Aquaculture* 155,103-115 pp.
- Rajkumar, M., Kumaraguru Vasagam, K.P., 2006. Suitability of the copepod, *Acartia clausi* as a live feed for seabass larvae (*Lates calcarifer* Bloch): compared to traditional live-food organisms with special emphasis on the nutritional value. *Aquaculture* 261 (2), 649-658 pp.
- Ribeiro, A., Ribeiro, L., Dinis, M.T., and Moren, M. (2011). Protocol to enrich rotifers (*Brachionus plicatilis*) with iodine and selenium. *Aquaculture Research*, 42 (2011), 1737-1740 pp.
- Ribeiro, L., Zambonino-Infante, J.L., Cahu, C. and Dinis, M.T.(1999). Development of digestive enzymes in larvae of *Solea senegalensis*, Kaup 1858. *Aquaculture* 179: 465-473 pp.
- Rider, S.A., Davies, S.J., Jha, A.N., Fisher, A.A., Knight, J., Sweetman, J.W., 2009. Supranutritional dietary intake of selenite and selenium yeast in normal and stressed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): implications on selenium status and health responses. *Aquaculture* 295 (3-4), 282-291 pp.
- Rodríguez Villanueva J.L. y Peleteiro Alonso, J.B. (2014). Cultivo del lenguado senegalés (*Solea senegalensis*). Capítulo 4, 7-9 pp.

- Schipp, G., 2006. The use of calanoid copepods in semi-intensive, tropical marine fish larviculture. *Avances en Nutrición Acuicola VIII*. 8th Int. Symp. Aquatic Nutrition, University Autón. Nuevo León, Monterrey.
- Thiry, C., Ruttens, A., De Temmerman, L., Schneider, Y., Pussemier, L., 2012. Current knowledge in species-related bioavailability of selenium in food. *Food Chem* 130, 767-784 pp.
- van der Meeren, T., Olsen, R.E., Hamre, K. and Fyhn, H.J., 2008. Biochemical composition of copepods for evaluation of feed quality in production of juvenile marine fish. *Aquaculture* 274, (2-4), 375-397 pp.
- Wang, C., Lovell, R.T., 1997. Organic selenium sources, selenomethionine and selenoyeast, have higher bioavailability than an inorganic selenium source, sodium selenite, in diets for channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Aquaculture* 152 (1-4), 223-234 pp.
- Wilcox, J., Tracy, P., Marcus, N., 2006. Improving live feeds: effect of a mixed diet of copepod nauplii (*Acartia tonsa*) and rotifers on the survival and growth of first-feeding larvae of the southern flounder, *Paralichthys lethostigma*. *Journal of the World Aquaculture Society* 37 (1), 113-120 pp.

ANEXOS

Comunicaciones de congreso de este Trabajo Fin de Grado

Ponce, M., Fernández-Díaz, C., Navas-Porras, F., Morales, E., Giraldez, I., Hachero Cruzado, I. Efecto del enriquecimiento de rotíferos con selenita sobre el rendimiento larvario de lenguado senegalés (*Solea senegalensis*). Póster en XVI Congreso Nacional de Acuicultura, 2017, Zaragoza, España.